



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - CCB  
DEP. DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E  
GENÉTICA BEG

DAIANE PEREIRA INÁCIO

**Análise da Variabilidade Genética de Populações de  
*Drosophila polymorpha* de Santa Catarina Usando um  
Marcador Nuclear e um Mitocondrial.**

**FLORIANÓPOLIS  
2016**



**DAIANE PEREIRA INÁCIO**

**Análise da Variabilidade Genética de Populações de  
*Drosophila polymorpha* de Santa Catarina Usando um  
Marcador Nuclear e um Mitocondrial.**

Trabalho apresentado como requisito parcial para  
obtenção do grau em Licenciatura em  
Ciências Biológicas da Universidade Federal de  
Santa Catarina.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Norma Machado da Silva.  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Daniela Cristina De Toni.

**FLORIANÓPOLIS  
2016**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Inácio, Daiane Pereira

Análise da Variabilidade Genética de Populações de  
*Drosophila polymorpha* de Santa Catarina Usando um Marcador  
Nuclear e um Mitocondrial. / Daiane Pereira Inácio ;  
orientadora, Norma Machado Da Silva ; coorientadora,  
Daniela Cristina De Toni. - Florianópolis, SC, 2016.  
78 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Biológicas. Graduação em Ciências Biológicas.

Inclui referências

1. Ciências Biológicas. 2. *Drosophila polymorpha*. 3.  
Genética de Populações. 4. Gene period e COI. 5. Santa  
Catarina. I. Da Silva, Norma Machado. II. De Toni, Daniela  
Cristina. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela saúde e pela força que me concedeu para não me deixar abater diante das dificuldades.

Aos meus pais, Dorotea e Ivon, que sempre me incentivam nos meus estudos me apoiando com o seu amor incondicional.

Ao meu esposo, Gabriel, pela paciência e compreensão nas várias oportunidades em que tivemos que abdicar de momentos de lazer para que eu pudesse me dedicar ao TCC.

À professora Dra. Norma Machado da Silva que aceitou prontamente o convite para ser minha orientadora nesse trabalho. Pela dedicação que dispensou durante todas as suas fases, fazendo-se presente e acessível, tanto pessoalmente quanto pelas inúmeras trocas de emails realizadas, inclusive aos finais de semana. Buscou acompanhar e orientar desde os procedimentos em laboratório até a produção textual, indicando vários artigos para fomentar a pesquisa e sempre procurando o desenvolvimento e aprimoramento do trabalho.

À professora Dra. Daniela Cristina De Toni, como co-orientadora e coordenadora do projeto contribuiu com a sua grande experiência taxonômica com *Drosophila* sendo muito importante para identificação e separação das espécies capturadas nas Unidades de Conservação. A todos o meu muito obrigada.



## RESUMO

INÁCIO, D. P. 2016. **Análise da Variabilidade Genética de Populações de *Drosophila polymorpha* de Santa Catarina Usando um Marcador Mitocondrial e um Nuclear.** Trabalho de Conclusão de Curso – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

A espécie *Drosophila polymorpha* pertence à família Drosophilidae, subgênero *Drosophila*, grupo *cardini*, e é uma dentre as várias espécies desta família que são conhecidas popularmente como “moscas-das-frutas”. Para acessar a variabilidade genética de três populações foram usados dois marcadores, um de DNA nuclear, o gene *period*, e um de DNA mitocondrial, o gene citocromo oxidase subunidade I (COI). Foram realizadas coletas em três unidades de conservação, que são: a Reserva Biológica Estadual da Canela Preta, Reserva Biológica Estadual do Aguai e o Parque Estadual da Serra do Tabuleiro, distribuídas respectivamente nas regiões norte, sul e central do Estado de Santa Catarina, usando-se armadilhas com frutas fermentadas. Os indivíduos de *D. polymorpha* foram separados com base em caracteres morfológicos. Para as análises foi extraído DNA genômico total de 12 machos de cada população. Com base nas sequências obtidas dos dois marcadores a partir das amostras de cada população foram realizadas análises de polimorfismo, testes de neutralidade, cálculo de *Fst* e a construção de redes de haplótipos através do uso de diferentes softwares. Com o marcador COI, a população que apresentou maior diversidade tanto de nucleotídeos ( $\pi$ ) como de haplótipos (H) foi Canela Preta,

e com o marcador *period* foi a população Aguai. A maioria dos testes de neutralidade para o gene *period* apresentaram desvios negativos e significativos, principalmente quando as populações foram analisadas juntas, indicando que este padrão de polimorfismo pode ter sido causado por algum evento de expansão demográfica ou por seleção purificadora, entretanto mais análises necessitam ser feitas para verificação da provável causa. Já os testes com as sequências do gene COI não apresentaram desvios significativos da neutralidade. Com o marcador *period* os valores de *Fst* não indicam estruturação entre as populações. Entretanto, com o *COI*, as comparações Aguai e Tabuleiro, e, Tabuleiro e Canela Preta os valores de *Fst* indicam uma estruturação genética moderada entre estas populações, que pode estar sendo causada pela destruição dos corredores de Mata que interligam estas populações.

Palavras-chave: *Drosophila polymorpha*. Genética de Populações. Gene *period* e COI. Santa Catarina.



## ABSTRACT

INÁCIO, D. P. 2016. **Análise da Variabilidade Genética de Populações de *Drosophila polymorpha* de Santa Catarina Usando um Marcador Mitocondrial e um Nuclear.** Trabalho de Conclusão de Curso – Cursos de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

*Drosophila polymorpha* species belongs to Drosophilidae family, subgenus *Drosophila*, *cardini* group, and is popularly known as “fruit fly”, like other species of this family. To access the genetic variability of three populations two markers were used, one nuclear gene (*period*), and one mitochondrial gene (cytochrome oxidase subunit I –COI). Samples were collected from three units conservation: State Biological Reserve of Canela Preta, State Biological Reserve of Aguai and State Park of Serra do Tabuleiro, distributed respectively in the north, south and central regions of the Santa Catarina State. To obtain samples were used traps containing fermented fruits. *D. polymorpha* species was separated from others based on morphological characters. The total genomic DNA was extracted from 12 male of each population. Sequences obtained from populations were used for the analysis of polymorphism, neutrality tests, Fst statistic, and for the construction of haplotypes network, using different softwares. Based on COI marker, Canela Preta was the population with the greatest nucleotide ( $\pi$ ) and haplotype (H) diversity, however, with the *period* marker was the Aguai population. The most neutrality tests for the *period* gene produced negative and significant deviations, mainly when the populations were analyzed together,

indicating that the polymorphism found may be caused by a demographic expansion event or purifying selection. However, further analysis need to be done to clarify the probable cause. Neutrality tests from COI sequences showed no significant deviations. Based on *period* sequences the populations have no structure, indicating that they are genetically homogeneous. However, using COI, the  $F_{st}$  values between Aguaí and Tabuleiro, Tabuleiro and Canela Preta, indicate a moderate genetic structure among these populations. The destruction of the forest corridors that connect these populations may be the cause of this differentiation.

Keywords: *Drosophila polymorpha*. Population genetics. *Period* and COI gene. Santa Catarina

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coordenadas geográficas das populações amostradas.	36
Tabela 2. Índices de diversidade genética de populações de <i>D. polymorpha</i> de Santa Catarina, usando o marcador nuclear <i>period</i> . .....	43
Tabela 3. Valores de Fst e polimorfismo compartilhado e não compartilhado entre as populações de <i>D. polymorpha</i> usando o gene <i>period</i> .....	44
Tabela 4. Testes de Neutralidade usados para analisar o polimorfismo de um fragmento do gene <i>period</i> em populações de <i>D. polymorpha</i> de Santa Catarina. ....	48
Tabela 5. Índices de diversidade genética de populações de <i>D. polymorpha</i> de Santa Catarina, usando marcador mitocondrial COI. ....	51
Tabela 6. Valores de Fst e polimorfismo compartilhado e não compartilhado entre as populações de <i>D. polymorpha</i> usando o gene COI.....	52
Tabela 7. Testes de Neutralidade usados para analisar o polimorfismo de um fragmento do gene COI em populações de <i>D. polymorpha</i> de Santa Catarina.....	55



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do locus <i>period</i> de <i>Drosophila melanogaster</i> . .....	31
Figura 2. Localização das três Unidades de Conservação onde foram realizadas as coletas... ..	35
Figura 3. Armadilha utilizada para captura de <i>Drosophilas</i> confeccionadas segundo o modelo de Tidon & Sene (1988).....	36
Figura 4. Rede de haplótipos das sequências do gene <i>period</i> nas três populações de <i>D. polymorpha</i> . .....	46
Figura 5. Rede de haplótipos das sequências do gene Citocromo oxidase I nas três populações de <i>D. polymorpha</i> .....	54





## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>23</b>
1.1 A família Drosophilidae e a <i>Drosophila polymorpha</i> .....	23
1.2 Marcadores Moleculares: o gene <i>period</i> e a citocromo oxidase I.....	29
<b>2. JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVO.....</b>	<b>34</b>
3.1 Objetivo Geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
<b>4. METODOLOGIA .....</b>	<b>35</b>
4.1 Coleta e Identificação das amostras .....	35
4.2 Extração de DNA .....	37
4.3 Amplificação dos marcadores moleculares e sequenciamento.....	37
4.3.1 <i>Period</i> (nuclear).....	37
4.3.2 Citocromo oxidase I (mitocondrial).....	38
4.3.3 Eletroforese.....	38
4.4 Análises das sequências.....	39
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>39</b>
5.1. Padronização das condições de amplificação do fragmento do gene <i>period</i> .....	39
5. 2 Caracterização da sequência do gene <i>period</i> .....	40
5.3 Análises de diversidade com o marcador <i>period</i> .....	41
5.4 Distribuição dos haplótipos do gene <i>period</i> .....	44
5.5 Testes de neutralidade com o gene <i>period</i> .....	46
5.6 Padronização das condições de amplificação do fragmento do gene COI.....	48
5.7 Caracterização da sequência do gene COI .....	49
5.8 Análises de diversidade com o marcador COI .....	49
5.9 Distribuição dos Haplótipos do gene COI.....	53
5.10 Testes de neutralidade com o gene COI.....	54
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>55</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>57</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>67</b>







## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 A família Drosophilidae e a *Drosophila polymorpha*

As moscas do gênero *Drosophila*, consideradas como moscas de pequeno porte, estão posicionadas dentro da classe Insecta, ordem Díptera, família Drosophilidae. Tornaram-se um organismo modelo no estudo da genética há mais de um século, através das contribuições clássicas da equipe de Thomas Morgan, cujos trabalhos buscavam desvendar uma gama de processos biológicos no campo da genética, como a hereditariedade e o mapeamento gênico (Powell, 1997; Jennings, 2011).

A família Drosophilidae é composta por cerca de 4.157 espécies distribuídas em 75 gêneros existentes e 3 gêneros extintos, sendo o gênero *Drosophila* (ainda existente) o mais abundante (Yassin, 2013). Atualmente o gênero *Drosophila* é subdividido em 8 subgêneros, dentre os quais os subgêneros *Drosophila* e *Sophophora* são os que contêm o maior número de espécies (Taxodros:<http://www.taxodros.uzh.ch/search/class.php>).

Acessado em 04 de abril de 2016).

Registros fósseis datam a origem da família Drosophilidae entre 50 a 60 milhões de anos. Podem ser localizadas tanto ao nível do mar quanto em altas altitudes, desde áreas de clima temperado até zonas equatoriais (Throckmorton, 1975). Porém, apesar de terem uma ampla distribuição geográfica, são nos trópicos que a família Drosophilidae ocorre em maior abundância e diversidade, pois são ambientes complexos com uma vegetação variada, e

apresentam sub-regiões com diferentes microclimas e microhabitats (Throckmorton, 1975; Val *et al.*, 1981).

As moscas da família Drosophilidae, principalmente as integrantes do gênero *Drosophila*, são conhecidas popularmente como “mosca-das-frutas”. Estas moscas caracterizam-se por serem insetos de elevada abundância e de fácil captura na natureza, apresentam ciclo de vida curto e algumas espécies são bastante sensíveis a mudanças em seus ambientes (Powell, 1997; Da Mata *et al.*, 2008). A denominação popular de “mosca-das-frutas” ou “mosca-do-vinagre” em muito se deve a dieta alimentar desses animais. Estas moscas se alimentam de material vegetal em decomposição, como frutos, fungos e flores, e elas têm a capacidade de refletir mudanças ecológicas e ambientais uma vez que espécies diferentes apresentam diferentes exigências com relação à qualidade do ambiente (Ferreira & Tidon, 2005; Mateus *et al.*, 2006). Esses substratos em decomposição não servem apenas de fonte de alimento para os indivíduos adultos, eles fornecem ambientes ricos em matéria orgânica, que são explorados pelas diferentes espécies da família Drosophilidae para a deposição de seus ovos e o desenvolvimento das das larvas, que assim como os adultos, alimentam-se do substrato de fungos ali presente (Gottschalk, 2004). Esses sítios de criação divergem de acordo com cada espécie e algumas exploram diversos tipos de substratos, como sítios de alimentação e criação de larvas, que vão desde flores, fungos, frutas e verduras, até uma série variada de outros resíduos de lixo produzidos pelo homem (Carson, 1971).

Algumas espécies da família Drosophilidae têm sido

utilizadas como bioindicador ambiental, para avaliação do estado de preservação de ecossistemas e do nível de poluição (Da Mata *et al.*, 2008). Nesse sentido, destaca-se a sua capacidade de refletir variações ecológicas e ambientais, uma vez que espécies diferentes apresentam diferentes exigências com relação à qualidade do ambiente (Ferreira & Tidon, 2005; Mateus *et al.*, 2006). Alguns estudos apontam que a queda da diversidade de espécies de *Drosophilidae* nativas está ligada diretamente com o nível de urbanização (Ferreira & Tidon, 2005; Gottschalk *et al.*, 2007). E o fato de possuírem um ciclo de vida curto também favorece seu uso como bioindicador, pois esta característica resulta em uma rápida resposta fisiológica às alterações ambientais, possibilitando aos pesquisadores a detecção e o monitoramento de sinais de distúrbios do meio (Da Mata *et al.*, 2010).

Presume-se que o subgênero *Drosophila* se originou nos trópicos do velho mundo há cerca de 42 milhões de anos, e então se espalhou para o Novo Mundo. Já o grupo *cardini* teve sua origem no Novo Mundo (Throckmorton, 1975). Este grupo foi denominado por Sturtevant no ano de 1942. É composto por 16 espécies de diferentes áreas neotropicais da América, que possuem como característica em comum a pigmentação do corpo altamente polimórfica, que se manifesta não só pela intensidade da pigmentação, mas também no padrão de pigmentação abdominal dos seus membros. O grupo *cardini* é subdividido em dois subgrupos de espécies, *cardini* (nove espécies) e *dunni* (sete espécies), de acordo com características da morfologia externa e da genitália masculina. O subgrupo *dunni* é endêmico das Ilhas

Caribenhas, já o subgrupo *cardini* encontra-se na área continental, estendendo-se do México ao sul do Brasil e norte da Argentina, além do Chile (Heed, 1962).

Pertencente ao grupo *cardini* se encontra a *Drosophila polymorpha* que é o objeto de estudo do presente trabalho. Geograficamente, está distribuída desde a Guatemala até o Brasil, incluindo Granada e Trinidad (Vilela *et al.*, 2002). Esta espécie tem sido alvo de estudos principalmente ligados ao polimorfismo de pigmentação do corpo e a inversões cromossômicas (Rohde & Valente, 1996; De Toni *et al.*, 2001; Brisson *et al.*, 2005). A *D. polymorpha* é uma das espécies mais polimórficas deste grupo em termos de pigmentação do corpo, variando em indivíduos com o abdomen quase completamente pigmentado aos que possuem abdomen praticamente sem pigmento (Martinez & Cordeiro 1970). Assim, Da Cunha (1949) propôs três padrões de coloração dos tergitos abdominais, o fenótipo claro, fenótipo intermediário e o fenótipo escuro (Machado *et al.*, 2001).

Os padrões de pigmentação abdominal de alguns exemplares do grupo *cardini* têm auxiliado a interpretação de filogenias e padrões de distribuição dessas espécies a partir de pesquisas ecológicas e evolutivas (De Toni *et al.*, 2002). O estudo de Machado *et al.*, (2001) detectaram forte relação entre o polimorfismo de pigmentação abdominal de *Drosophila polymorpha* e as condições de temperatura, sugerindo a ação da seleção natural na regulação térmica, isso porque as moscas coletadas em períodos mais frios possuíam maior pigmentação abdominal (negra) do que as coletadas em épocas quentes, de

forma que a coloração negra permite uma vantagem adaptativa na absorção de calor (Machado *et al.*, 2001). Em outro trabalho, Brisson *et al.* (2005) encontraram um efeito significativo do tipo de habitat no fenótipo de pigmentação abdominal de diferentes localidades, e verificaram que a pigmentação em *D. polymorpha* está associada com resistência à dessecação, uma vez que os indivíduos negros sobreviveram significativamente mais tempo em um ambiente de dessecação do que os indivíduos claros.

O polimorfismo de inversão cromossômica tem um importante papel nos processos evolutivos de muitas espécies, pois está envolvido nos mecanismos de adaptação, especiação e na heteromorfia dos cromossomos sexuais, principalmente em Dípteros (Kirkpatrick, 2010). Alguns trabalhos têm se dedicado a estudar o polimorfismo e as diferenças fixadas de inversões entre as espécies de *Drosophila*. As inversões sofrem o efeito da seleção natural e deriva aleatória. Assim, uma inversão cromossômica que captura dois ou mais alelos adaptados às condições ambientais locais causa uma vantagem seletiva que pode se espalhar (Kirkpatrick, 2010).

Em um estudo cujo objetivo era analisar o polimorfismo cromossômico de *D. polymorpha* em diferentes comunidades catarinenses, verificou-se que populações insulares foram mais polimórficas que as continentais e se atribuiu esse fato a maior heterogeneidade ambiental de algumas ilhas (De Toni *et al.*, 2001). Em outro trabalho, também com populações catarinenses de *D. polymorpha*, oriundas de três unidades de conservação (Reserva Biológica Estadual da Canela Preta, Reserva Biológica Estadual do

Aguai e Parque Estadual da Serra do Tabuleiro), verificou-se que estas populações apresentaram relativamente o mesmo grau de polimorfismo de inversões cromossômicas, as quais seriam mantidas possivelmente pela ação da seleção natural (Wildemann, 2014). No trabalho de Da Cunha *et al.*, 1953, onde foram analisadas inversões em *D. polymorpha* e *D. cardinoides*, os autores verificaram que a primeira espécie era mais polimórfica que a segunda, pois foram detectadas seis diferentes inversões cromossômicas em *D. polymorpha* ao passo que para a *D. cardinoides* foram encontradas apenas três inversões. Em uma revisão feita por Hoffman & Rieseberg (2008), os autores relatam que há uma grande variedade de características associadas ao polimorfismo de inversão em espécies de *Drosophila*, esses traços incluem a forma da asa, o tamanho da asa e do tórax, resistência térmica, resistência à fome, o tempo de desenvolvimento, fecundidade, longevidade, e o sucesso de acasalamento dos machos.

Entretanto, não há trabalhos sobre a estrutura genética de populações desta espécie de nenhuma região da sua área de distribuição. Na verdade, as espécies do grupo *cardini* foram pouco estudadas do ponto de vista molecular. Trabalhos nesta área com espécies do grupo *cardini* são os de Wilder & Hollocher (2003) usando genes nucleares para analisar o processo de especiação no subgrupo *dunni* em ilhas caribenhas, o de Wilder *et al.* (2002) que isolou e caracterizou sequências de microssatélites também em espécies do subgrupo *dunni*, e o de Pelandakis & Solignac (1993) com sequências de rDNA mitocondrial para análises filogenéticas



em espécies de *Drosophila*, incluindo algumas do grupo *cardini*. Os trabalhos de Loreto *et al.*, (1998) e Herédia *et al.*, (2004) abordam a distribuição e evolução de elementos de transposição.

## **1.2 Marcadores Moleculares: o gene *period* e a citocromo oxidase I**

Para identificar a diversidade genética de uma espécie existem importantes ferramentas denominadas marcadores moleculares, que podem ser um segmento específico de DNA ou uma sequência oriunda de um gene expresso. Marcadores moleculares podem revelar polimorfismos de sequências que nos permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes. Diferentes marcadores podem ter taxas de substituição/evolução diferentes, de modo que, através de uma escolha cuidadosa dos marcadores adequados, pode-se estudar desde problemas de identificação de indivíduos à identificação de espécies crípticas ou formulação de hipóteses filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos (Solé-Cava, 2004). Diferentes marcadores moleculares têm sido amplamente empregados em análises de populações naturais para verificar a estruturação de tais populações, a existência de fluxo gênico e nas investigações de eventos ecológicos e evolutivos. Sendo assim, os marcadores ajudam a contar a história evolutiva de uma espécie (Chambers & Macavoy, 2000; Kimberly *et al.*, 2006). Para uma sólida compreensão dos padrões e processos evolutivos é necessário relacionar a genética do organismo com o ambiente no qual ele vive, associando o conhecimento genético com um contexto

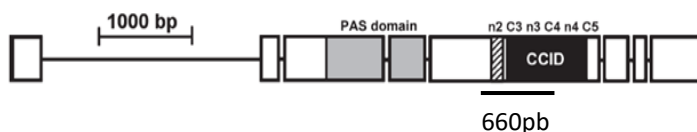
ecológico, pois são aspectos que se complementam (Tidon, 2006). A quantidade de variabilidade presente em uma população está positivamente ligada ao número de nichos ecológicos explorados por uma espécie (Da Cunha *et al.*, 1953). A capacidade de adaptação em meios distintos é preponderante para a preservação de uma espécie, ainda mais quando se considera as grandes e rápidas mudanças ambientais que vêm ocorrendo por todo o planeta, assim quanto maior for o repertório de diferentes alelos de uma população, maiores serão suas chances de sobreviver a alterações no meio (Mateus & Sene, 2003).

Para acessar a variabilidade genética de três populações de *Drosophila polymorpha* foram escolhidos dois marcadores moleculares, sendo um marcador de DNA nuclear e outro mitocondrial. A razão pela qual se optou por tipos diferentes de marcadores está ligada à presença de características próprias de cada marcador, o que consequentemente amplia as possibilidades de análises neste estudo. Ficou definido como marcador de DNA nuclear (nDNA) o gene *period* e como marcador mitocondrial o gene citocromo oxidase subunidade I (COI).

Em espécies de *Drosophila* o gene nuclear *period* (PER) é ligado ao cromossomo X e está fortemente relacionado ao ciclo circadiano dessas moscas (Citri *et al.*, 1987; Franco *et al.*, 2010). Sua composição é formada por oito éxons (sequências codificantes) responsáveis pela codificação da proteína (PER) com aproximadamente 1.200 aminoácidos (Citri *et al.*, 1987).

Na figura 1, está representada a estrutura do *lôcus period* caracterizado em *Drosophila melanogaster*. Os éxons estão

identificados por caixas, enquanto os íntrons (sequências não codificantes) por linhas. No domínio PAS (ou região C2), representado pela cor cinza, encontram-se os éxons três e quatro. Em seguida, localizadas no quinto éxon, estão as regiões não conservadas n2, n3 e n4, intercaladas com as regiões altamente conservadas C3, C4 e C5 (Colot *et al.*, 1988). A região rachurada n2, que varia de tamanho entre diferentes espécies, representa uma região que contém repetições de trincas de nucleotídeos que na proteína corresponde às repetições dos aminoácidos treonina e glicina. Esta região tem sido bastante estudada por ser bastante variável e estar relacionada com compensação de temperatura (Sawyer *et al.*, 1997). A estrutura preta corresponde ao CCID ou domínio inibitório. O domínio PAS é responsável pela interação entre as proteínas PER e TIM (codificada pelo gene *timeless*), que também é uma importante proteína envolvida no ciclo circadiano de *Drosophila* (Tauber & Kyriacou, 2008).



**Figura 1: Estrutura do locus *period* de *Drosophila melanogaster*.** A barra abaixo da estrutura do gene indica a região analisada no presente trabalho. Fonte: extraído de Franco *et al.*, (2010).

Estudos têm demonstrado que o produto do gene *period* está envolvido na música de corte dos machos da *Drosophila melanogaster* (Kyriacou & Hall, 1980), ou seja, o som utilizado pelos machos para atrair as fêmeas da mesma espécie, e por essa razão tem sido considerado como um potencial gene de especiação

(Colot *et al.*, 1988; Coyne, 1992). Está relacionado também ao sistema de acasalamento espécie-específico, ao sucesso reprodutivo e fertilidade, além do tempo de duração da cópula (Beaver & Giebultowicz, 2004).

O gene *period* possui regiões de relativa conservação e ao seu entorno, regiões que apresentam altas taxas evolutivas, o que normalmente não permite o alinhamento de espécies diferentes (Colot *et al.*, 1988). Em virtude dessa característica, tornou-se uma importante ferramenta no que se refere às análises comparativas em níveis intra e interespecíficos (Kliman & Hey, 1993). As regiões variáveis deste gene também têm sido usadas para acessar a variação genética intra-específica de diferentes espécies de *Drosophila* (Gleason & Powell, 1997; Kyriacou *et al.*, 2007; Legrand *et al.*, 2009; Franco *et al.*, 2010; Legrand *et al.*, 2011).

O DNA mitocondrial em eucariotas remonta à uma proteobactéria que se fundiu endosimbioticamente a uma célula pré-eucariótica no início da história de vida. Ao longo da evolução, este genoma citoplasmático perdeu a maior parte do seu DNA para o núcleo e atualmente é normalmente representada em células animais por apenas 37 genes ligados ao longo de uma molécula circular fechada em torno de 17.000 pares de nucleotídeos de comprimento (Avice, 2009). O DNA mitocondrial está presente em grande parte dos organismos eucariontes e sua herança é preponderantemente materna. Há um grande número de cópias do genoma mitocondrial por célula e ele também pode ser extraído e analisado a partir de amostras antigas. Sequências mitocondriais têm sido utilizadas em estudos populacionais por apresentarem

polimorfismo intraespecífico e evolução mais rápida que o nDNA (Arif & Khan, 2009). A taxa de evolução no nível da sequência de nucleotídeos é em torno de 1-10 vezes mais rápida do que sequências de DNA nuclear de cópia única (Avisé *et al.*, 1987), o que se traduz em um pré-requisito para análises filogeográficas e torna o mtDNA um bom marcador para eventos demográficos (Avisé *et al.*, 1987; Avisé, 2009). O gene mitocondrial codificante da enzima citocromo oxidase subunidade I tem sido empregado em estudos populacionais e de filogeografia em diferentes espécies de insetos, como as do gênero *Drosophila* (Hurtado *et al.*, 2004; Mirol *et al.*, 2007; Pfeiler *et al.*, 2007; Richmond *et al.*, 2013), mosquitos tais como *Anopheles farauti* (Ambrose *et al.*, 2014) e *Anopheles pseudopunctipennis* (Juri *et al.*, 2014) e no simulídeo *Simulium tani* (Low *et al.*, 2014).

## 2. JUSTIFICATIVA

Este TCC faz parte de um projeto maior intitulado “Avaliação da preservação e conectividade entre três fragmentos de floresta ombrófila densa do leste catarinense utilizando drosofilídeos (Insecta: Diptera) como bioindicadores”, que está sendo desenvolvido no Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética desta Universidade. O projeto acima citado envolve uma abordagem ecológica, com levantamento da diversidade de espécies de *Drosophila* coletadas em três Unidades de Conservação (UC) de Santa Catarina, a aplicação de índices ecológicos e também uma abordagem molecular. Juntamente com abordagens ecológicas, as abordagens genéticas têm um papel

fundamental na avaliação da biodiversidade e conservação de ambientes. Sendo assim, os resultados produzidos neste TCC serão, posteriormente, analisados em conjunto com os demais dados moleculares e ecológicos e estas informações contribuirão para um melhor entendimento da dinâmica de populações de *Drosophila* em ambientes de Mata Atlântica, e para uma avaliação do estado de conservação de três UC's do Estado de Santa Catarina que se encontram dentro deste bioma.

### **3. OBJETIVO**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Avaliar a variabilidade e a estrutura genética de três populações de *Drosophila polymorpha* oriundas de Unidades de Conservação do Estado de Santa Catarina, usando dois marcadores moleculares.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Isolar e amplificar fragmentos dos genes citocromo oxidase I e *period*;
- Usar as sequências dos dois genes nas análises de variabilidade genética de populações de *Drosophila polymorpha*, através do uso de diferentes softwares comumente empregados para tais análises.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Coleta e Identificação das amostras

As coletas foram realizadas em três unidades de conservação, que são: a Reserva Biológica Estadual da Canela Preta, Reserva Biológica Estadual do Aguaí e o Parque Estadual da Serra do Tabuleiro, distribuídas respectivamente nas regiões norte, sul e central do Estado de Santa Catarina (Figura 2, Tabela 1). Para a captura das moscas foram utilizadas 80 armadilhas, feitas a partir de garrafas PET (Figura 3) confeccionadas segundo Tidon & Sene (1988). As armadilhas continham como isca uma mistura de banana, laranja e abacaxi fermentados. Estas armadilhas foram distribuídas ao longo das trilhas (penduradas em árvores) para aumentar a abrangência amostral do local. As trilhas percorridas em cada UC foram definidas em conjunto com os responsáveis pelas unidades de conservação, no sentido de maximizar a variabilidade ambiental das coletas.



**Figura 2. Localização das três Unidades de Conservação onde foram realizadas as coletas.** As três unidades estão localizadas no Estado de Santa Catarina, sul do Brasil.

Pontos de Coleta	Coordenadas Geográficas	
Unidades de Conservação	Latitude	Longitude
Canela Preta	27° 16' 9,55"S	49° 08' 0,02"W
Serra do Tabuleiro	27° 45' 3,71"S	48° 47' 0,89"W
Aguai	28° 25' 33,86"S	49° 32' 39,61"W

**Tabela 1.** Coordenadas geográficas das populações amostradas



**Figura 3.** Armadilha utilizada para captura de *Drosophilas* confeccionadas segundo o modelo de Tidon & Sene (1988). Imagem extraída de PENARIOL *et al.* 2008.

A classificação taxonômica das espécies foi feita com base em caracteres morfológicos utilizando-se chave de identificação de gêneros e espécies de *Drosophila* (Freire-Maia & Pavan, 1949). As amostras de *Drosophila polymorpha* foram colocadas em tubos de 1,5ml com etanol absoluto e armazenadas em freezer para posterior extração de DNA.



## 4.2 Extração de DNA

Realizou-se a extração de DNA total apenas de machos, pois o marcador nuclear, o gene *period*, em *Drosophila* está localizado no cromossomo X (Citri *et al.*, 1987; Franco *et al.*, 2010), e desta forma garantimos à amplificação, por PCR, de apenas um alelo. O DNA total foi extraído de 12 machos individualmente de cada população, utilizando-se o PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante.

## 4.3 Amplificação dos marcadores moleculares e sequenciamento

O *software online Oligo Analyzer* (<https://www.idtdna.com/calc/analyzer>) foi utilizado para ajudar a definir o melhor par de *primers* para ambos os genes, a partir do alinhamento de sequências como descrito abaixo. As condições de amplificação foram padronizadas para ambos e são apresentadas no item Resultados e Discussão.

### 4.3.1 *Period* (nuclear)

O par de *primers* utilizado para amplificação de um fragmento do gene *period* foi: Per-F: 5' CTA AAC TAT AAC GAG AAC CTG CTG C 3' e Per-R: 5' GGK GCS GGT ATA TAR TAG AAG G 3'. Este par foi desenhado em regiões conservadas, a partir de um alinhamento de sequências de diferentes espécies de

*Drosophila*, as quais foram obtidas a partir do banco de dados GenBank: *Drosophila montana* (EF635097), *Drosophila virilis* (X13877) e *Drosophila willistoni* (U51069).

#### 4.3.2 Citocromo oxidase I (mitocondrial)

O par de *primers* utilizado para amplificação de um fragmento do gene citocromo oxidase I (COI) foi: COI-F: 5' CWA CAA ATC ATA AAG ATA TTG GAAC 3' e COI-R: 5' GTT TCC TTT TTT CCT GAT TCTTG 3'. Este par foi desenhado em regiões conservadas, a partir de um alinhamento de sequências de diferentes espécies de *Drosophila*, as quais foram obtidas a partir do banco de dados GenBank: *Drosophila cardini* (HM006874), *Drosophila capricorni* (EU493637), *Drosophila willistoni* (EU493643) e *Drosophila mauritiana* (NC005779).

#### 4.3.3 Eletroforese

Os produtos de PCR foram visualizados em géis de agarose 1% corados com Gel Red<sup>TM</sup> (Biotium), cujas bandas foram visualizadas num transiluminador sob luz UV.

#### 4.3.4 Sequenciamento

Os produtos de PCR dos dois genes das amostras populacionais de *Drosophila polymorpha* foram enviados para a empresa Helixxa, em Paulínia (São Paulo), para purificação e

sequenciamento direto dos produtos de PCR. Foi realizado sequenciamento de ambas as fitas.

#### **4.4 Análises das sequências**

Obteve-se a confirmação da identidade das sequências mediante o uso da ferramenta *Blast* (Altschul *et al.*, 1990) do banco de dados NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Os cromatogramas foram analisados usando-se o *software FinchTV* v1.3.0 (<http://www.geospiza.com/ftvdlinfo.html>). O *software BioEdit* (Hall, 1999) foi usado para a edição das sequências. As análises foram realizadas por meio dos seguintes softwares: *Mega 6* (Tamura *et al.*, 2013) para o alinhamento das sequências e análises de composição de nucleotídeos e aminoácidos; *DNASP 5.10.01* (Librado & Rozas, 2009) para análises do polimorfismo e testes de neutralidade (que permitem verificar se as sequências estão ou não evoluindo de maneira neutra); *Proseq 2.91* para o cálculo de *Fst* (Filatov & Charlesworth). As redes de haplótipos foram construídas usando-se o *software TCS 1.21* (Clement *et al.*, 2000), que utiliza um algoritmo de parcimônia estatística, e foi usado o limite de confiança de 95%.

### **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **5.1. Padronização das condições de amplificação do fragmento do gene *period***

As reações de PCR para amplificar um fragmento do gene nuclear *period* continham entre 15 e 50ng de DNA genômico total, 1U de *Pfu* DNA polimerase (*Thermo Scientific*), *Buffer* 1x, 1,8mM  $\text{MgSO}_4$ ; 150 $\mu\text{M}$  de cada dNTP, 0,4 $\mu\text{M}$  de cada *primer* para um volume final de 40 $\mu\text{l}$ . As condições de amplificação seguiram por uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C durante 3min, seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 50s, 53°C durante 50s e 72°C durante 1min, seguida por uma etapa final de extensão de 7 minutos a 72 °C.

## 5. 2 Caracterização da sequência do gene *period*

Foi analisado um fragmento de 660 pares de bases do gene nuclear *period* de 36 indivíduos machos coletados a partir de três populações. Este fragmento do gene *period* faz parte do exon 5, o qual contém as regiões variáveis n2 e n3 (Figura 1), onde é encontrado maior polimorfismo tanto intra como interespecífico. Esse polimorfismo inclui tanto substituições de nucleotídeos como indels (polimorfismo de tamanho) (Anexo 1). Polimorfismo de tamanho já foi encontrado em populações de *Drosophila melanogaster* da Australia (Sawyer *et al.*, 2006) e em populações de ilhas de *Drosophila mauritiana* (Legrand *et al.*, 2011).

Em relação à composição de nucleotídeos desta região a frequência encontrada foi: T (19,5%), C (25,0%), A (26,9%) e G (28,6%). A região analisada corresponde a uma sequência de 220 aminoácidos composta principalmente por resíduos de Glicina (13,19%) e Serina (11,38%). Em espécies de *Drosophila* do cluster

*buzzatii*, onde foi analisado um fragmento de 443pb, com uma parte em comum com a analisada no presente trabalho, apresentaram um alto conteúdo de nucleotídeos CG (em torno de 60%), principalmente na terceira posição do códon (Franco *et al.*, 2010). O conteúdo de aminoácidos varia bastante entre diferentes espécies de *Drosophila* principalmente devido a duas regiões que contêm repetições *in tandem* de determinados aminoácidos, e normalmente o conteúdo de glicinas e serinas é maior, em relação aos demais aminoácidos. Uma dessas repetições, de treoninas e glicinas, fica dentro da região n2, e o número de tais repetições pode ter variação intra-específica, e a outra que fica dentro da região n3 e contém repetições de glicinas. Essas repetições *in tandem* podem ser encontradas, por exemplo, em espécies dos grupos *willistoni* (Gleason & Powell, 1997) e *melanogaster* (Sawyer *et al.*, 2006), entretanto, nem todas as espécies de *Drosophila* as possuem, como foi o caso de *Drosophila polymorpha* neste trabalho.

### 5.3 Análises de diversidade com o marcador *period*

Foram amostrados 14 haplótipos do gene *period*, considerando as 3 populações, com uma diversidade média de 0,660 (Hd), sendo Canela Preta a que apresentou o menor número de haplótipos (4) e Aguai o maior (8) (Tabela 2). A diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) média foi de 0,00182, sendo que a menor diversidade foi encontrada na população de Canela preta ( $\pi$  = 0,00076), produzindo um menor número de haplótipos nesta população, e a maior diversidade foi encontrada em Aguai ( $\pi$  =

0,00292), o que gerou o maior número de haplótipos dentre as populações analisadas (Tabela 2). Comparativamente com outros trabalhos populacionais com espécies de *Drosophila*, onde o gene *period* foi usado como marcador para análises de diversidade, os valores de diversidade de nucleotídeos encontrados nestas populações de *Drosophila polymorpha* foram menores.

Koser (2015) analisou um fragmento de 440pb do gene *period* em populações de *Drosophila antonietae*, coletadas sobre cactáceas de matas de restinga em diferentes partes do Brasil, incluindo amostras de Florianópolis e de Laguna, e encontrou valores maiores de  $\pi$  para a grande maioria das populações (incluindo as de Santa Catarina). O valor médio de  $\pi$ , considerando todas as populações analisadas foi de 0,00439 ( $\pm 0,00055$ ). O fragmento de 440pb abrange as regiões conservadas C3 e C4 e as regiões variáveis n3 e n4, tendo, portanto, uma região em comum com o fragmento analisado no presente trabalho. Leal (2013), analisando o mesmo fragmento de 440pb, também encontrou maiores valores de  $\pi$  para a maior parte das populações de *Drosophila meridionalis* de diferentes partes do Brasil, sendo que o valor médio foi de 0,01017 ( $\pm 0,00065$ ). Em outro trabalho com populações de *Drosophila mauritiana*, sendo uma amostra coletada na Ilha Rodrigues e outra coletada em diferentes localidades da Ilha Maurícia (consideradas uma só amostra por não apresentarem estruturação), ambas ilhas localizadas no Oceano Índico, também apresentaram maiores valores de  $\pi$ . A população da ilha Rodrigues apresentou valor de  $\pi = 0,005$  e a da Ilha Maurícia  $\pi = 0,008$ . Neste caso, o tamanho do fragmento analisado do gene

*period* foi de 1023pb, entretanto os autores não esclarecem exatamente que regiões do gene este fragmento contém (Legrand *et al.*, 2011).

Índices	Populações			
	Aguai	Tabuleiro	Canela Preta	Total <sup>a</sup>
S	10	7	3	16
K	1,909	1,167	0,5	1,198
$\pi$	0,00292	0,00177	0,00076	0,0018
Hd	0,894	0,682	0,455	0,66
H	8	6	4	14
Sin	8	6	3	
NSin	2	1	0	

**Tabela 2. Índices de diversidade genética de populações de *D. polymorpha* de Santa Catarina, usando o marcador nuclear *period*. S** = número de sítios polimórficos; **K** = número médio de diferenças de nucleotídeos;  **$\pi$**  = diversidade de nucleotídeos; **H** = número de haplótipos; **Hd** = Diversidade de haplótipos; **Sin** = número de substituições sinônimas; **NSin** = número de substituições não sinônimas; **a** = considerando as populações juntas.

Os valores do índice de Fst foram analisados par-a-par comparando as populações, para avaliar as diferenças genéticas entre elas e consequentemente se apresentam estruturação. O maior valor de Fst encontrado foi entre as populações de Aguai e Canela Preta (Fst = 0,0255), e a menor diferenciação foi entre Tabuleiro e Canela Preta (Fst= -0,0169) (Tabela 3), sugerindo uma falta de estruturação genética destas populações. Embora os valores de Fst tenham sido baixos, o maior valor encontrado ocorreu entre as populações mais afastadas geograficamente, e o valor negativo foi entre as duas populações mais próximas geograficamente. A maior parte dos sítios polimórficos nesta

sequência do gene *period* não é compartilhado entre as populações (Tabela 3).

Comparação Populacionais	Valores de Fst	Polimorfismo Compartilhado	Polimorfismo não compartilhado
CP (1) X TB (2)	-0,0169 P=1,00	1	2 <sup>a</sup> / 6 <sup>b</sup>
AG (1) X TB (2)	0,0025 P=0,6110	3	7 <sup>a</sup> / 4 <sup>b</sup>
CP (1) X AG (2)	0,0255 P=0,2280	1	2 <sup>a</sup> / 9 <sup>b</sup>

**Tabela 3. Valores de Fst e polimorfismo compartilhado e não compartilhado entre as populações de *D. polymorpha* usando o gene *period*. CP= Canela Preta; TB= Tabuleiro; AG= Aguaí.**

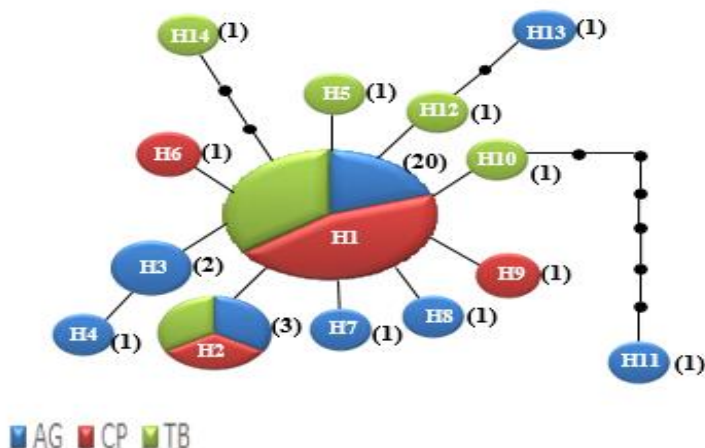
**a=** n° de sítios polimórficos na população 1 e monomórfico na população 2; **b=** n° de sítios polimórficos na população 2 e monomórfico na população 1.

#### 5.4 Distribuição dos haplótipos do gene *period*

A rede de haplótipos produzida apresenta um formato de estrela, com um considerável número de haplótipos raros separados por uma única diferença de nucleotídeo. Esta rede também mostra uma falta de clusterização de haplótipos por população (Figura 4). A maior parte dos haplótipos encontrados nas 3 populações são únicos, ou seja, representado por um único indivíduo, pois a maior parte do polimorfismo nesta sequência não é compartilhado entre as populações (Tabela 3). Embora tenha sido encontrado um número considerável de haplótipos únicos



(*singletons*), há um grande número de indivíduos (20) de um total de 36 analisados nas 3 populações, que compartilham o mesmo haplótipo. Portanto, H1 é o provável haplótipo ancestral, pois é o mais frequente, compartilhado por indivíduos das três populações (4 do Aguaí, 7 do Tabuleiro e 9 da Canela Preta) e os demais haplótipos derivam dele. O segundo haplótipo mais frequente (H2) é compartilhado por três indivíduos (1 do Tabuleiro, 1 do Aguaí e 1 da Canela Preta), e o terceiro mais frequente (H3) é compartilhado por dois indivíduos, ambos do Aguaí. Os demais H4 a H14 são representados por um único indivíduo das diferentes populações. O haplótipo H11 é de um indivíduo da população Aguaí que apresenta um polimorfismo de tamanho na sequência, ou seja, ele possui dois códons a menos. Embora *D. polymorpha* não possua as regiões de repetições *in tandem* de determinados aminoácidos, onde normalmente é encontrado polimorfismos intra-específico de tamanho, essa variação de tamanho está localizada dentro da região variável n3. A lista de indivíduos de cada haplótipo encontra-se no anexo 3.



**Figura 4. Rede de haplótipos das sequências do gene *period* nas três populações de *D. polymorpha*.** Cada linha da rede representa um passo mutacional e os pequenos círculos pretos representam haplótipos hipotéticos, não amostrados. As cores dos círculos representam as populações e o tamanho é proporcional à frequência do haplótipo. AG = Reserva Biológica Estadual do Aguai; CP = Reserva Biológica Estadual Canela Preta; TB = Parque Estadual da Serra do Tabuleiro. O número em parênteses é a quantidade de indivíduos que possuem o haplótipo.

## 5.5 Testes de neutralidade com o gene *period*

Foram feitas diferentes análises (Tajima's D; Fu e Li's D\*; Fu e Li's F\*; Fs de Fu e R2) para verificar se as sequências apresentam desvios significativos da neutralidade, ou seja, se elas estão ou não evoluindo de maneira neutra. Praticamente todos os testes de neutralidade empregados apresentaram desvios negativos e significativos, especialmente quando consideramos as 3 populações juntas. Quando considerando cada uma separadamente, a população Tabuleiro apresentou mais testes com

desvios significativos da neutralidade (Tabela 4). Estes desvios da neutralidade podem ser causados tanto por mecanismos de seleção quanto por eventos demográficos e a realização dos diferentes testes pode fornecer indícios do evento mais provável (Hurtado *et al.*, 2004; Juri *et al.*, 2014). Como os desvios encontrados foram negativos, estes podem ser resultantes de seleção purificadora. Em espécies de *Drosophila* do cluster *buzzatii* há indícios de seleção purificadora atuando na evolução da sequência deste gene (Franco *et al.*, 2010). Os diferentes testes para detectar desvios significativos da neutralidade usam estatísticas diferentes, e os resultados obtidos em cada um ajudam a providenciar evidências da provável causa que justificaria o padrão de polimorfismo encontrado. Os testes  $F_s$  de  $F_u$  e  $R_2$  são considerados como sendo mais eficientes para detectar desvios causados por eventos demográficos (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). Para o teste  $F_s$  de  $F_u$ , tanto quando consideradas isoladamente e quando juntas as populações apresentaram desvio significativo. Já o teste  $R_2$ , quando considerando as 3 populações juntas, apresentou desvio significativo ( $R_2 = 0,0474$ ), porém isoladamente, somente a população Aguaí apresentou desvio considerado significativo (Tabela 4). Tais resultados, juntamente com o formato de estrela da rede de haplótipos (Figura 4), parecem apontar para uma hipótese de expansão populacional, ocorrida provavelmente quando as florestas de Mata Atlântica de Santa Catarina eram maiores e mais conectadas entre si, e com um maior número de recursos para serem explorados, o que facilitaria esse processo de expansão. Entretanto, para termos certeza do provável evento que

explica o polimorfismo encontrado nestas populações de *D. polymorpha*, será necessário realizar uma análise de *Skyline-plot*, que nos fornecerá um gráfico com a flutuação no tamanho efetivo ( $N_e$ ) ao longo do tempo, permitindo-nos verificar se houve alterações significativas, ou seja, se ocorreram eventos de expansão quanto possíveis contrações (*bottleneck*), e ter uma estimativa de tempo, de quando estes possíveis eventos podem ter ocorrido no passado. Essa análise será feita com ambos os marcadores.

Populações				
Testes de Neutralidade	Aguai	Tabuleiro	Canela Preta	Total <sup>a</sup>
Tajima's D	-1,742	- 1,943*	-1,629	- 2,224***
Fu e Li's D*	- 2,137	- 2,388*	-1,953	-3,041*
Fu e Li's F*	- 2,311	- 2,579*	-2,115	-3,269*
Fs de Fu	- 4,198**	- 2,857**	- 2,124**	-10,40**
R2	0,094**	0,123	0,1443	0,047***

**Tabela 4. Testes de Neutralidade usados para analisar o polimorfismo de um fragmento do gene *period* em populações de *D. polymorpha* de Santa Catarina. a = considerando as populações juntas; \*P <0,05; \*\*P <0,02; \*\*\*P <0,01**

## 5.6 Padronização das condições de amplificação do fragmento do gene COI

As reações de PCR para amplificar um fragmento do gene citocromo oxidase I continham entre 15 e 50ng de DNA genômico total, 1U de *Pfu* DNA Polimerase (*Thermo Scientific*), *Buffer* 1X,

2.5 mM de MgSO<sub>4</sub>; 160  $\mu$ M de cada dNTP, 0.4  $\mu$ M de cada *primer* para um volume final de 40 $\mu$ l. As condições de amplificação foram: uma etapa inicial de desnaturação a 95 °C durante 3min, seguido de 35 ciclos a 95 °C durante 50s, 50°C durante 50s e 72°C durante 1min, seguida por uma etapa final de extensão de 7 minutos a 72 °C.

### 5.7 Caracterização da sequência do gene COI

Foi amplificado e analisado um fragmento de 663pb do gene mitocondrial COI, a partir dos mesmos 36 indivíduos machos coletados nas três populações de Santa Catarina. A composição de nucleotídeos deste fragmento é de T (37,8%), C (16,3%), A (28,7%) e G (17,3%). Este fragmento é composto por 66,5% de nucleotídeos AT, o que está de acordo com o conteúdo de nucleotídeos que tem sido encontrado em genes mitocondriais de *Drosophila* (Montooth *et al.*, 2009) (Anexo 2). A região amplificada corresponde a uma sequência de 221 aminoácidos composta principalmente por resíduos de Leucina (14,88%) e Isoleucina (14,42%).

### 5.8 Análises de diversidade com o marcador COI

Com este marcador o valor médio de  $\pi$  nas 3 populações foi = 0,00261, sendo que agora foi a população Canela Preta que apresentou o maior valor tanto de  $\pi$  (0,00288) como o maior número de haplótipos (5). O valor médio da diversidade de

haplótipos nas 3 populações foi 0,752 (Tabela 5). O valor médio da diversidade de nucleotídeos com este marcador é maior em relação à diversidade média apresentada pelo marcador *period*, entretanto, no COI uma parte considerável do polimorfismo encontrado é compartilhado entre as populações, e é formado apenas por substituições sinônimas (Tabelas 5 e 6).

O valor médio de diversidade de nucleotídeos ( $\pi$ ) encontrado no COI destas populações de *D. polymorpha* é superior ao encontrado em outros trabalhos com COI em populações de *Drosophila* do Brasil, como por exemplo, Gustani *et al.*, (2015) encontrou o valor de  $\pi$  médio= 0,000269 que produziram 6 haplótipos nas populações de *D. ornatifrons* coletadas em Guarapuava/PR, Chapecó/SC e no Noroeste e litoral do Rio Grande do Sul. De Ré *et al.*, 2014 analisou populações de *D. maculifrons* da região sul (RS, PR e SC, e uma do Sudeste) e encontrou o valor de  $\pi$  médio= 0,00012 ( $\pm$  0,00007), que produziu 4 haplótipos. Das populações de SC, foram analisadas uma amostra de Florianópolis e outra de Concórdia, entretanto os autores não apresentam os valores de  $\pi$  médio das populações por região. Já comparado com o valor médio encontrado para amostras de 4 populações de *D. buzzatii* (0,00465  $\pm$  0,00130) do sul do Brasil (Brito *et al.*, 2002a), o de *D. polymorpha* é menor. No trabalho de Brito *et al.*, (2002a) foram analisados apenas 8 indivíduos das 4 populações e encontraram 6 haplótipos diferentes.

Nas três populações de *D. polymorpha* analisadas foram identificados 8 sítios polimórficos (S), com um número médio de diferenças nucleotídicas (k) de 1,730, que é um valor maior em

relação ao valor médio apresentado com o marcador *period* (1,198), cuja média acabou ficando baixa devido ao baixo polimorfismo encontrado na população de Canela Preta.

Índices	Populações			
	Aguai	Tabuleiro	Canela Preta	Total <sup>a</sup>
<b>S</b>	3	5	6	8
<b>K</b>	1,136	1,803	1,909	1,730
<b><math>\pi</math></b>	0,00171	0,00272	0,00288	0,00261
<b>Hd</b>	0,682	0,712	0,833	0,752
<b>H</b>	3	4	5	6
<b>Sin</b>	3	5	6	

**Tabela 5. Índices de diversidade genética de populações de *D. polymorpha* de Santa Catarina, usando marcador mitocondrial COI. S** = número de sítios polimórficos; **K** = número médio de diferenças de nucleotídeos;  **$\pi$**  = diversidade de nucleotídeos; **H** = número de haplótipos; **Hd** = Diversidade de haplótipos; **Sin** = número de substituições sinônimas; **a** = considerando as populações juntas.

Com relação aos valores de  $F_{st}$ , Canela Preta e Aguai, que são as mais distantes geograficamente, não apresentam diferenciação genética. As comparações Canela Preta e Tabuleiro ( $F_{st}= 0,1378$ ), assim como Aguai e Tabuleiro ( $F_{st}= 0,1535$ ), apresentaram valores estatisticamente significativos (Tabela 6), mostrando que entre estas populações já há alguma diferenciação genética neste marcador. As discrepâncias encontradas quando se compara os resultados de  $F_{st}$  de ambos os marcadores podem ser explicadas pela diferença no nível de ploidia entre eles, que tem um grande impacto no tempo de coalescência e na forma de como eles reconstroem as relações entre os grupos. Como o COI é um

marcador mitocondrial, faz parte de um genoma haplóide e herdado maternalmente, o tamanho populacional efetivo ( $N_e$ ) e o tempo de coalescência são menores do que um gene ligado ao X (como é o caso do gene *period*). Os marcadores nucleares são mais lentos para indicar processos de estruturação genética, comparado com o DNA mitocondrial, sendo mais adequados para indicar divergências recentes (Toews & Brelsford, 2012). Sequências mitocondriais e do cromossomo Y, devido ao seu nível de ploidia e forma de herança, tendem a detectar eventos e processos recentes na história evolutiva de uma espécie, enquanto sequências de genes autossômicos e ligados ao X primariamente detectam eventos e processos mais antigos (Templeton, 2011).

Comparações populacionais	Valores de $F_{st}$	Polimorfismo compartilhado	Polimorfismo não compartilhado
CP (1) X TB(2)	0,1378 <b>P= 0,0470</b>	3	$3^a / 2^b$
AG (1) X TB(2)	0,1535 <b>P=0,0430</b>	3	$0^a / 2^b$
CP (1) X AG (2)	-0,0442 <b>P=0,8160</b>	3	$3^a / 0^b$

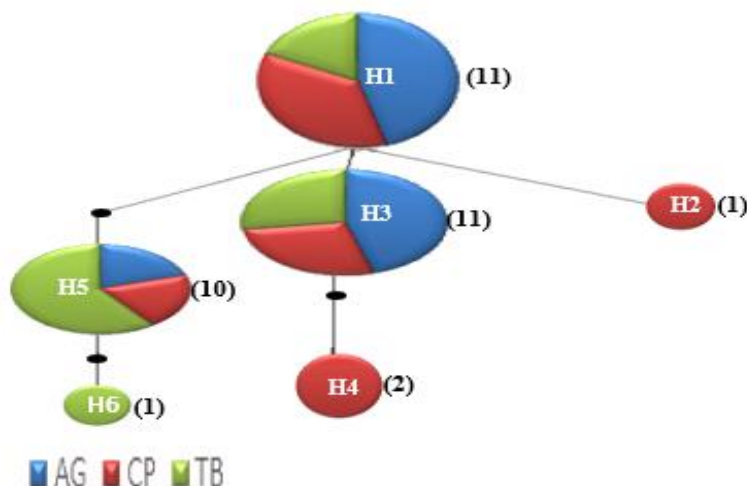
**Tabela 6. Valores de  $F_{st}$  e polimorfismo compartilhado e não compartilhado entre as populações de *D. polymorpha* usando o gene *COI*. CP= Canela Preta; TB= Tabuleiro; AG= Aguai.**

**a=** n° de sítios polimórficos na população 1 e monomórfico na população 2; **b=** n° de sítios polimórficos na população 2 e monomórfico na população 1.



### **5.9 Distribuição dos Haplótipos do gene COI**

Devido ao fato da maior parte do polimorfismo ser compartilhado entre as populações, foi produzido um menor número de haplótipos. A rede de haplótipos com este marcador não apresenta um formato de estrela, sendo que dos 6 haplótipos encontrados, 3 (50%) são compartilhados pelas 3 populações, e apenas os haplótipos H2 e H6 são haplótipos únicos, representados por um único indivíduo. Esta rede também não mostrou uma clusterização de haplótipos por população. Os haplótipos mais frequentes são H1 (11 indivíduos), H3 (11 indivíduos) e H5 (10 indivíduos) compartilhados por indivíduos oriundos das 3 populações. O haplótipo H4 com duas sequências sendo ambas de Canela Preta (Figura 5). Embora os haplótipos H1 e H3 possuem o mesmo número de indivíduos, o H1 é o provável haplótipo ancestral pois os demais derivam dele. A lista de indivíduos de cada haplótipo encontra-se no anexo 4.



**Figura 5.** Rede de haplótipos das sequências do gene Citocromo oxidase I nas três populações de *D. polymorpha*. Cada linha da rede representa um passo mutacional e os pequenos círculos pretos representam haplótipos hipotéticos, não amostrados. As cores dentro dos círculos representam as populações e o tamanho é proporcional à frequência do haplótipo. AG = Reserva Biológica Estadual do Aguaí; CP = Reserva Biológica Estadual Canela Preta; TB = Parque Estadual da Serra do Tabuleiro. O número em parenteses é a quantidade de indivíduos que possuem o haplótipo.

### 5.10 Testes de neutralidade com o gene COI

Os diferentes testes estatísticos aplicados para verificar se as sequências do COI estão evoluindo de uma maneira neutra, não apresentaram desvios significativos da neutralidade. Quando analisadas em conjunto as populações apresentaram testes com valores negativos, porém, não foram significativos, demonstrando estar evoluindo de forma neutra. Genes mitocondriais em *Drosophila* sofrem forte seleção purificadora, embora alguns genes em alguns grupos de *Drosophila* apresentam sinais de forte

seleção positiva (Montooth *et al.*, 2009). Embora ele seja um marcador comumente utilizado para detectar alterações demográficas (Brito *et al.*, 2002a; Brito *et al.*, 2002b; Mirol *et al.*, 2007; Pfeiler *et al.*, 2007; Juri *et al.*, 2014), os testes Fs de Fu e R2, considerados sensíveis em detectar as marcas deixadas por este tipo de evento (Ramos-Onsins & Rozas, 2002), não apresentaram desvios significativos (Tabela 7).

Testes de Neutralidade	Populações			
	Aguai	Tabuleiro	Canela Preta	Total <sup>a</sup>
<b>Tajima's D</b>	0,47201	0,3280	-0,14923	- 0,30089
<b>Fu e Li's D*</b>	1,10492	-0,13525	0,70614	-0,67353
<b>Fu e Li's F*</b>	1,06823	-0,01947	0,55237	- 0,65298
<b>Fs de Fu</b>	0,951	0,679	-0,330	0,217
<b>R2</b>	0,1894	0,1839	0,1523	0,1078

**Tabela 6.** Testes de Neutralidade usados para analisar o polimorfismo de um fragmento do gene COI em populações de *D. polymorpha* de Santa Catarina. a = considerando as populações juntas.

## 6. CONCLUSÕES

Os marcadores utilizados no presente trabalho apresentaram diferentes tipos de polimorfismos: COI apenas substituições sinônimas, e o *period* apresentou tanto substituições sinônimas (a maioria), como não sinônimas e indel.

Com o marcador COI, a população que apresentou maior diversidade tanto de nucleotídeos como de haplótipos foi Canela Preta, e com o marcador *period* foi a população Aguai.

Com o marcador *period* as 3 populações não apresentam estruturação, ou seja, são homogêneas geneticamente. Esta homogeneidade pode estar sendo causada por seleção purificadora, visto que foi encontrado um baixo polimorfismo de nucleotídeos, e a maior parte dos indivíduos das 3 populações compartilham o mesmo haplótipo. Além do fato, de ser um marcador nuclear, com um nível de ploidia e modo de herança diferente do COI.

Alguns indícios apontam para a atuação de seleção purificadora como provável causa para o padrão de polimorfismo encontrado no gene *period*, tais como: registro da ação de seleção purificadora em um fragmento do gene *period* em espécies de *Drosophila* do cluster *buzzatii*; o marcador COI não apresentou desvios significativos da neutralidade, embora ele seja considerado um bom marcador para eventos demográficos. Entretanto, mais análises com ambos os marcadores serão realizadas para conclusões mais precisas.

Os valores significativos de  $F_{st}$  encontrados com o marcador COI entre as populações Tabuleiro e Aguai ( $F_{st}=0,1535$ ), e Tabuleiro e Canela Preta ( $F_{st}=0,1378$ ), podem significar um início de diferenciação entre estas populações, como resultado da fragmentação das florestas no Estado, que com o tempo pode acabar isolando estas populações. Os resultados oriundos das análises ecológicas que estão sendo produzidos no projeto do qual este faz parte também ajudarão a verificar esta hipótese.

## REFERÊNCIAS

AVISE, J.C.; ARNOLD, J.; BALL, R.M.; BERMINGHAM, E.; LAMBT, T.; NEIGEL, J.E.; REEB, C.A.; SAUNDERS, N.C. 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA bridge between population genetics and Systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.18: p. 489-522.

AVISE, J. C. 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36: p. 3–15.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. 1990. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215: p. 403-410.

AMBROSE, L.; COOPE, R.D.; RUSSELL, T.L.; BURKOT, T.R.; LOBO, N.F.; COLLINS, F.H.; HIL, J.;BEEBE, N.W. 2014. Microsatellite and mitochondrial markers reveal strong gene flow barriers for *Anopheles farauti* in the Solomon Archipelago: implications for malaria vector control. **International Journal for Parasitology**, v. 44: p. 225–233.

ARIF, I. A.; KHAN, H.A. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. **Animal Biodiversity and Conservation**, v. 32: p. 9 -17.

BEAVER, L. M.; GIEBULTOWICZ, J.M. 2004. Regulation of copulation duration by *period* and *timeless* in *Drosophila melanogaster*. **Current Biology**, v. 14: p. 1492–1497.

BRISSON, J.A.; DE TONI, D.C.; DUNCAN, I.; TEMPLETON, A.R. 2005. Abdominal pigmentation variation in *Drosophila polymorpha*: geographic variation in the trait, and underlying phylogeography. **Evolution**, v. 59: p. 1046-1059.

BRITO, R.A.; MANFRIN, M.H.; SENE, F.M. 2002a. Mitochondrial DNA phylogeography of brazilian populations of *Drosophila buzzatii*. **Genetics and Molecular Biology**, v.25: p. 161-171.

BRITO, R.A.; MANFRIN, M.H.; SENE, F.M. 2002b. Nested cladistic analysis of brazilian populations of *Drosophila serido*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 22: p. 131-143.

CARSON, H.L. 1971. **The ecology of *Drosophila* breeding sites**. University of Hawaii, Honolulu. Harold L. Lyon Arboretum Lecture, v. 2: p. 27

CHAMBERS, G.K.; MACAVOY, E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 126: p. 455-76.

CITRI, Y.; COLOT, H.V.; JACQUIER, A.C.; HALL, J.C.; BALTIMORE, D.; ROSBASH, M. 1987. A family of unusually spliced biologically active transcripts encoded by a *Drosophila* clock gene. **Nature**, v. 326: p. 42-47

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v. 9: p. 1657-1660.

COLOT, H.V.; HALL, J.C.; ROSBACH, M. 1988. Interspecific comparison of the *period* gene of *Drosophila* reveals large blocks of non-conserved coding DNA. **The EMBO Journal**, v. 7: p. 3929-3937.

COYNE, J.A. 1992. Genetics and speciation. **Nature**, v. 335: p. 511-515.

DA CUNHA, A.B.; BRNCIC, D.; SALZANO, F.M. 1953. A comparative study of chromosomal polymorphism in certain south american species of *Drosophila*. **Heredity**, v. 7: p. 193-202

DA MATA, R.; MCGEOCH, M.; TIDON, R. 2008. *Drosophilid* assemblages as a bioindicator system of human disturbance in the Brazilian Savanna. **Biodiversity and Conservation**, v. 17: p. 2899-2916.

DA MATA, R.A.; TIDON, R.; CÔRTEZ, L.G.; DE MARCO JUNIOR, P.; DINIZ-FILHO, J. A.F. 2010. Invasive and flexible: niche shift in the *drosophilid* *Zaprionus indianus* (Insecta, Diptera). **Biological Invasions**, v.12: p. 1231-1241.

DE RÉ, F. C.; GUSTANI, E. C.; OLIVEIRA, A. P. F.; MACHADO, L. P. B.; MATEUS, R. P.; LORETO, E. L. S.; ROBE, L. J. 2014. Brazilian populations of *Drosophila maculifrons* (Diptera: Drosophilidae): low diversity levels and signals of a population expansion after the Last Glacial Maximum. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 112: p. 55–66.

DE TONI, D. C.; HERÉDIA, F. O.; VALENTE, V. L. S. 2001. Chromosomal variability of *Drosophila polymorpha* populations from Atlantic Forest remnants of continental and insular environments in the State of Santa Catarina, Brazil. **Caryologia**, v. 54: p. 329–337.

DE TONI, D. C.; HOFMANN, P. R. P.; VALENTE, V. L. S. 2002. Polimorfismos de pigmentação em *Drosophila*. **Naturalia**, v. 27: p. 231-243,

FERREIRA, L.B.; TIDON, R. 2005. Colonizing potential of Drosophilidae (Insecta, Diptera) in environments with different grades of urbanization. **Biodiversity and Conservation**, v. 14: p. 1809-1821.

FILATOV, D.A.; CHARLESWORTH, D. 1999. DNA polymorphism, haplotype structure and balancing selection in the *Leavenworthia* PgiC locus. **Genetics**, v. 153(3): p. 1423–1434

FRANCO, F.F.; SILVA-BERNARDI, E.C.C.; SENE, F.M.; HASSON, E.R.; MANFRIN, M. H. 2010. Intra-and interspecific divergence in the nuclear sequences of the clock gene *period* in species of the *Drosophila buzzatii* cluster. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research**, v. 48: p. 322-331.

FREIRE-MAIA, N.; PAVAN, C. 1949. Introdução ao estudo da *Drosophila*. **Cultus**, v. 5: p. 1-171

GLEASON, J.M.; POWELL, J.R. 1997. Interspecific and Intraspecific Comparisons of the *period* Locus in the *Drosophila willistoni* Sibling Species. **Molecular Biology and Evolution**, v.14: p. 741-53.

GOTTSCALK, M.S. 2004. **Influência da urbanização sobre assembleias de Drosophilidae na cidade de Florianópolis, SC, Brasil**. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 111pages.

GOTTSCALK, M.S.; DE TONI, D.C.; VALENTE, V.L.S.; HOFMANN, P.R.P. 2007. Mudanças em assembleias brasileiras de *Drosophilidae* (Diptera) em um gradiente de urbanização. **Neotropical Entomology**, v.36: p. 848-862.

GUSTANI, E.C.; OLIVEIRA, A.P.F.; SANTOS, M.H.; MACHADO, L.P.B.; MATEUS, R. P. 2015. Demographic structure and evolutionary history of *Drosophila ornatifrons* (Diptera, Drosophilidae) from Atlantic Forest of Southern Brazil. **Zoological Science**, v. 32: p. 141-150.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v.41: p. 95-98.

HEED, W.B. 1962. **Genetic characteristics of island populations**. University of Arizona, Tucson, v. 6205: p. 173-206.

HERÉDIA, F.; LORETO, E.L.S.; VALENTE, V.L.S. 2004. Complex evolution of *gypsy* in drosophilid species. **Molecular Biology and Evolution**, v. 2: p. 1831-1842.

HOFFMAN, A.A.; RIESEBERG, L.H. 2008. Revisiting the impact of inversions in evolution: from population genetic markers to drivers of adaptive shifts and speciation? **Annual Review of Ecology Evolution and Systematics**. v. 39: p. 21–42.



HURTADO, L.A.; EREZ, T.S.; CASTREZANA, T.A. 2004. Contrasting population genetic patterns and evolutionary histories among sympatric Sonoran Desert cactophilic *Drosophila*. **Molecular Ecology**, v. 13: p. 1365–1375.

JENNINGS, B.H. 2011. *Drosophila* – A versatile model in biology and medicine. **Materials Today**, v.14: p. 190-195.

JURI, M.J.D.; MORENO, M.; IZAGUIRRE, M.J.P.; NAVARRO, J.C.; ZAIDENBERG, M. O.; ALMIRÓN, W.R.; CLAPS, G.L.; CONN, J.E. 2014. Demographic history and population structure of *Anopheles pseudo punctipennis* in Argentina based on the mitochondrial COI gene. **Parasites & Vectors**, v.7: p. 1-9.

KIMBERLY, A.; SELKOE, R.; TOONEN, J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. **Ecology Letters**, v.9: p. 615-629.

KIRKPATRICK, M. 2010. How and why chromosome inversions evolve. **PLoS Biology**, v.8: p. 100-110.

KLIMAN, R.M.; HEY, J. 1993. DNA sequence variation at the *period* locus within and among species of the *Drosophila melanogaster* complex. **Genetics**, v.133: p. 375–387.

KOSER, J.R. 2015. **Estrutura populacional e filogeografia de *Drosophila antonietae* Tidon & Sene**. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 71 pags.

KYRIACOU, C.P.; HALL, J.C. 1980. Circadian rhythm mutations in *Drosophila melanogaster* affect short-term fluctuations in the male's courtship song. **Genetics**, v.77: p. 6929–6933.

KYRIACOU, C.P.; PEIXOTO, A.A.; COSTA, R. 2007. A cline in the *Drosophila melanogaster period* gene in Australia: neither down nor under. **Journal of Evolutionary Biology**, v.20: p. 1649-1641.

LEAL, B.D.Y. 2013. **História demográfica e estrutura de populações para a espécie cactófila *Drosophila meridionalis***. Dissertação (Tese de mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 105pages.

LEGRAND, D.; CHENEL, T.; CAMPAGNE, C.; LACHAISE, D.; CARIOU, M.L. 2011. Species of the *D. simulans* complex: Past history and /or speciation in progress? **Molecular Ecology**, v.20: p. 2787–2804.

LEGRAND, D.; TENAILLON, I.M.; MATYOT, P.; GERLACH, J.; LACHAISE, D.; CARIOU, M. 2009. Species-wide genetic variation and demographic history of *Drosophila sechellia*, a species lacking population structure. **Genetics**, v. 182: p. 1197–1206.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. 2009. DnaSPv5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25: p. 1451–1452.

LORETO, E.L.S.; SILVA, L.B.; ZAHA, A.; VALENTE, V.L.S. 1998. Distribution of transposable elements in Neotropical species of *Drosophila*. **Genetica**, v.101: p. 153–165.

LOW, L.; ADLER, P.H.; TAKAOKA, H.; YA'COB, Z.; LIM, P.E.; TAN, T.K.; LIM, Y.L.; CHEN, C.D.; NORMA-RASHID, Y.; AZIRUN, M.S. 2014. Mitochondrial DNA markers reveal high genetic diversity but low genetic differentiation in the Black Fly *Simulium tani* Takaoka & Davies along an elevational gradient in Malaysia. **PLOS ONE**, v.9: p. 1-9.

MACHADO, M.X.; DE TONI, D.C.; HOFMANN P.R.P. 2001. Abdominal pigmentation polymorphism of *Drosophila polymorpha* (Dobzhansky and Pavan, 1943) collected on Ilha de Santa Catarina and neighboring islands. **Biotemas**, v. 14: p. 87-107.

MARTINEZ, M.N.; CORDEIRO A.R. 1970. Modifiers of colour pattern genes in *Drosophila polymorpha*. **Genetics**, v. 64: p. 573-587.

MATEUS, R.P.; SENE, F.M. 2003. Temporal and spatial allozyme variation in the South American cactophilic *Drosophila antonietae* (Diptera, Drosophilidae). **Biochemical Genetics**, v. 41: p. 219-233.

MATEUS, R.P.; BUSCHINI, M.L.T.; SENE, F.M. 2006. The *Drosophila* community in xerophytic vegetations of the upper Parana-Paraguay river basin. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66: p. 719-729.

MIROL, P.M.; SCHÄFER, M.A.; ORSINI, L.; ROUTTU, J.; SCHLÖTTERER, C.; HOIKKALA, C.A.; BUTLIN, R.K. 2007. Phylogeographic patterns in *Drosophila montana*. **Molecular Ecology**, v. 16: p. 1805-1097.

MONTOOTH, K.L.; ABT, D.N.; HOFMANN, J.W.; RAND, D.M. 2009. Comparative Genomics of *Drosophila* mtDNA: Novel Features of Conservation and Change Across Functional Domains and Lineages. **Journal of Molecular Evolution**, v. 69: p. 94-114.

PELANDAKIS, M.; SOLIGNAC, M.1993. Molecular phylogeny of *Drosophila* based on ribosomal RNA sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v. 37: p. 525-543.

PENARIOL, L., BICUDO, H.E.M.C. & MADI-RAVAZZI, L. 2008. On the use of open or closed traps in the capture of drosophilids. **Biota Neotropica**, v. 8: p. 2.

PFEILER, E.; EREZ, T.; HURTADO, L.A.; MARKOW, T.A. 2007. Genetic differentiation and demographic history in *Drosophila pachea* from the Sonoran Desert. **Hereditas**, v. 144: p. 63-74.

POWELL, J.R.1997.**Progress and prospects in evolutionary biology: The *Drosophila* model**. Oxford University Press. Inglaterra. p. 578.

RAMOS-ONSINS, S.E.; ROZAS, J. 2002. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth. **Molecular Biology and Evolution**, v. 19: p. 2092-2100.

RICHMOND, M.P.; JOHNSON, S.; HASELKORN, T.S.; LAM, M.; REED, L.K.; MARKOW, T.A. 2013. Genetic differentiation of island populations: geographical barrier or a host switch? **Biological Journal of the Linnean Society**, v.108: p. 68–78.

ROHDE, C.; VALENTE, V.L. 1996. Cytological maps and chromosomal polymorphism of *Drosophila polymorpha* and *Drosophila cardinoides*. **Brazilian Journal of Genetics**, v.19: p. 27-32.

SAWYER, L.A.; HENNESSY, J.M.; PEIXOTO, A.A.; ROSATO, E.; PARKINSON, H.; COSTA, R.; KYRIACOU, C.P. 1997. Natural variation in a *Drosophila* clock gene and temperature compensation. **Science**, v. 278: p. 2117–2120.

SAWYER, L.A.; SANDRELLI, F.; PASETTO, C.; PEIXOTO, A.A.; ROSATO, E.; COSTA, R.; KYRIACOU, C.P. 2006. The Period Gene Thr-Gly Polymorphism in Australian and African *Drosophila melanogaster* Populations: Implications for Selection. **Genetics**, v.174: p.465-480.

SOLÉ-CAVA, A. 2004. **Biodiversidade molecular e genética da conservação**. In: Matioli, S.R. (eds). *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto. Holos: p.171-192.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30: p. 2725-2729.

TAXODROS, 2016. Taxodros: Classification. Disponível em: < <http://www.taxodros.uzh.ch/search/class.php> >. Acesso em: 4 abr. 2016.

TAUBER, E.; KYRIACOU, C.P. 2008. Genomic approaches for studying biological clocks. **Functional Ecology**, v. 22: p. 19–29.

TEMPLETON, A.R. 2011. **Fluxo Gênico e História Populacional**. In: *Genética de Populações e História Microevolutiva*. p. 204-246. Editora SBG, Ribeirão Preto.

THROCKMORTON, L.H. 1975. **The phylogeny, ecology, and geography of *Drosophila***. In *Handbook of Genetics*. King, R. C. (eds). New York. Plenum: p. 421–459.

TIDON, R.; SENE, F.M.1988. **A trap that retains and keeps *Drosophila* alive**. *Drosophila Information Service*, v. 67.p. 90.

TIDON, R. 2006. Relationships between drosophilids (Diptera, Drosophilidae) and the environment in two contrasting tropical vegetations. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 87. p. 233-247.

TOEWS, D.P.L.; BRELSFORD, A. 2012. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. **Molecular Ecology**, v. 21: p. 3907-3930.

VAL, F.C.; VILELA, C. R.; MARQUES, M.D. 1981. **Drosophilidae of the Neotropical Region**. In: Ashburne, M. R.; Carson, H. L.; Thompson, J. N.(eds). *The Genetics and Biology of Drosophila*. London. Academic Press. v. 3: p.123-168

VILELA, C.R.; SILVA, A.F.G.; SENE, F.M. 2002. Preliminary data on the geographical distribution of *Drosophila* species within morphoclimatic domains of Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 46: p. 139-148.

WILDER, J.A.; HOLLOCHER, H. 2003. Recent radiation of endemic Caribbean *Drosophila* of the *dunni* subgroup inferred from multilocus DNA sequence variation. **Evolution**, v. 57: p. 2566-2579.

WILDER, J.A.; DIAZ, T.; O'NEILL, R.J.W.; KENNEY, J.; HOLLOCHER, H. 2002. Characterization and isolation of novel microsatellites from the *Drosophila dunni* subgroup. **Genetical Research**, v.80: p. 177-185.

WILDEMANN, B. 2014. **Análise do desenvolvimento e estudo do polimorfismo de inversão cromossômica de *Drosophila polymorpha* (Diptera, drosophilidae) e sua relação com genes de choque térmico (HSPs) induzidos por estresse físico/químico.** Dissertação (Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 71p.

YASSIN, A. 2013. Phylogenetic classification of the Drosophilidae *Rondani* (Diptera): the role of morphology in the postgenomic era. **Systematic Entomology**, v.38: p.349–364.







[illegible]



```

      *      660
AG1  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
AG2  : GGTTTACCACACCCTCGGTC : 660
AG3  : GGTTTACCACACCCTCGGTC : 660
AG4  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
AG5  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
AG6  : GGTTTACCACACCCTCGGTC : 660
AG7  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
AG8  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
AG9  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
AG10 : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 654
AG11 : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
AG12 : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
CP1  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
CP2  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
CP3  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
CP4  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
CP5  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
CP6  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
CP7  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
CP8  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
CP9  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
CP10 : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
CP11 : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
CP12 : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
TB1  : GTGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
TB2  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
TB3  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
TB4  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
TB5  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
TB6  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
TB7  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
TB8  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
TB9  : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
TB10 : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
TB11 : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
TB12 : GGTTTACCACGCCCCTCGGTC : 660
      GcGTTTACCACGCCCCTCGGTC

```









\* 660

CP1 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 CP2 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 CP3 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 CP4 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 CP5 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 CP6 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 CP7 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 CP8 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 CP9 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 CP10 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 CP12 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 CP11 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 AG1 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 AG2 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 AG3 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 AG4 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 AG5 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 AG6 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 AG7 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 AG8 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 AG9 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 AG10 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 AG11 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 AG12 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 TB1 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 TB2 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 TB3 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 TB4 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 TB5 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 TB6 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 TB7 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 TB8 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 TB9 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 TB10 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 TB11 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 TB12 : TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT- : 663  
 TTTTCGGACA~~T~~CCAGAAGTTTAT



### ANEXO 3

Lista de indivíduos por haplótipo, para o gene *period*, considerando as 3 populações.

CP= Canela Preta; AG= Aguai; TB= Tabuleiro

Haplótipos	Lista de indivíduos CP	Lista de indivíduos AG	Lista de indivíduos TB
H1	2;3;4;6;7;8;9;11;12	4;5;7;11	3;5;6;8;10;11;12
H2	10	1	2
H3		2;6	
H4		3	
H5			7
H6	1		
H7		9	
H8		12	
H9	5		
H10			4
H11		10	
H12			9
H13		8	
H14			1

## ANEXO 4

Lista de indivíduos por haplótipo, para o gene *COI*, considerando as 3 populações.

CP= Canela Preta; AG= Aguai; TB= Tabuleiro

<u>Haplótipos</u>	Lista de indivíduos CP	Lista de indivíduos AG	Lista de indivíduos TB
H1	1;5;10;12	1;3;4;7;9	7;9
H2	11		
H3	2;3;9	6;8;10;11;12	2;3;6
H4	7;8		
H5	4;6	2;5	1;4;5;8;11;12
H6			10

